

**PCT**

**NOTIFICATION D'ELECTION**

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

21 juillet 2000 (21.07.00)

Demande internationale no

PCT/FR99/02827

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

MJPcb539/79

Date du dépôt international (jour/mois/année)

18 novembre 1999 (18.11.99)

Date de priorité (jour/mois/année)

18 novembre 1998 (18.11.98)

Déposant

RENARD, Michel etc

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

16 juin 2000 (16.06.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

**PCT**

## AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

VIALLE-PRESLES, Marie-José  
Cabinet Ores  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

- 2 JUN 2000

Date d'expédition (jour/mois/année) 25 mai 2000 (25.05.00)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPCb539/79		<b>AVIS IMPORTANT</b>
Demande internationale no PCT/FR99/02827	Date du dépôt international (jour/mois/année) 18 novembre 1999 (18.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 18 novembre 1998 (18.11.98)
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:  
AU,CN,JP,KP,KR,MA,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:  
AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SD,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW  
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 25 mai 2000 (25.05.00) sous le numéro WO 00/29585

### RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

### RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire:

VIALLE-PRESLES, Marie-José  
Cabinet Ores  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 13 janvier 2000 (13.01.00)	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb539/79	
Demande internationale no PCT/FR99/02827	Date du dépôt international (jour/mois/année) 18 novembre 1999 (18.11.99)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 18 novembre 1998 (18.11.98)
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) etc	

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un **astérisque(\*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
18 nove 1998 (18.11.98) 98/14470		FR	20 déce 1999 (20.12.99)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Marc Salzman

no de téléphone (41-22) 338.83.38

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb539/79	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02827	Date du dépôt international (jour/mois/année) 18/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 18/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/29		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRO... et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/06/2000	Date d'achèvement du présent rapport 05.02.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Ury, A N° de téléphone +49 89 2399 8411 

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02827

## I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

### Description, pages:

1-13                      version initiale

### Revendications, N°:

1-12                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02827

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 2-4, 8-12
	Non : Revendications 1, 5-7
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-12
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :  
**voir feuille séparée**

**Point V.**

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: WO 96/24674

D2: WO 94/13814

D3: WO 95/27791

- I) Le problème que se propose de résoudre la présente demande réside dans l'identification d'une enzyme impliquée dans l'activité LPAAT chez le colza (*Brassica napus*).

L'état de la technique montre que des enzymes LPAAT ont déjà été clonées chez d'autre plantes, en particulier chez *Limnanthes douglasii* (voir D1), chez *Zea mays* (voir D2) et à partir d'endosperme de noix de coco (voir D3); voir également la description de la présente demande pages 4-5.

Par ailleurs l'art antérieur montre également que certaines séquences peptidiques, dont les séquences FPEGTRS et/ou PFKKGA, sont communes à des séquences d'enzymes LPAAT antérieurement connues (voir la présente demande pages 5-6, D1 Figs. 5-7 et D3 Fig. 16).

Enfin, la présence d'une activité LPAAT chez le colza était reconnue, comme indiqué dans D1, page 2 et D3, page 3, lignes 30-34 (voir description page 3, lignes 12-16).

Ainsi, pour résoudre le problème posé l'homme du métier, fort de l'enseignement de l'état de la technique, aurait essayé avec des chances raisonnables de succès et serait arrivé par des techniques classiques à cloner le gène LPAAT chez le colza. Outre la méthode décrite dans l'exemple 1 de la demande d'autres approches étaient possibles comme par exemple l'utilisation de sondes oligonucléotidiques correspondant aux séquences FPEGTRS et/ou PFKKGA communes à des séquences d'enzymes LPAAT antérieurement connues.

En conséquence, l'objet du présent jeu de revendications ne semble pas faire preuve d'activité inventive (Article 33.3 PCT).

- II) 1) La séquence peptidique de la LPAAT d'endosperme de noix de coco (voir D3) présente 31,2% d'identité avec la présente SEQ ID NO:2, sur un recouvrement de 231aa. Ainsi pour l'ensemble de la SEQ ID NO:2, l'identité avec la séquence de D3 est supérieure à 20%. En conséquence, D2 détruit la nouveauté de la revendication 1 (Article 33.3 PCT).
- 2) Dans la mesure où la séquence de la LPAAT selon la présente demande est présente à l'état sauvage chez le colza, aucune caractéristique distinctive ne permet de distinguer une cellule de colza sauvage ou une plante de colza sauvage des cellules et plantes revendiquées dans les revendications 5-7. A noter que les termes "recombinant" et "transformée" ne sauraient conférer aux dites cellules et plantes une quelconque caractéristique distinctive.
- En conséquence, les objets des revendications 5, 6 et 7 sont anticipés (Article 33.2 PCT) par n'importe quelle cellule et plante de colza naturelles.

**Point VII.**

La figure 1 mentionnée page 4, ligne 27 de la demande est absente.



Translation  
09/856275

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED  
NOV 2 0 2001  
TECH CENTER 1600  
NOV 2 1 2001  
TECH CENTER 1600

Applicant's or agent's file reference MJPcb539/79	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/409)	
International application No. PCT/FR99/02827	International filing date (day/month/year) 18 November 1999 (18.11.99)	Priority date (day/month/year) 18 November 1999 (18.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/29		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 June 2000 (16.06.00)	Date of completion of this report 05 February 2001 (05.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02827

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-13, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-12, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02827

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-4, 8-12	YES
	Claims	1, 5-7	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: WO 96/24674

D2: WO 94/13814

D3: WO 95/27791

I. The problem that the present application aims to solve can be considered to be that of the identification of an enzyme involved in LPAAT activity with rape seed (*Brassica napus*).

The prior art describes how LPAAT enzymes have already been cloned in other plants, particularly in *Limnanthes douglasii* (see D1), in *Zea mays* (see D2), and from coconut endosperm (see D3); see, as well, the description of the present application on pages 4-5.

In addition, the prior art also discloses that some peptide sequences, including FPEGTRS and/or PFKKGA, are common to previously known LPAAT enzyme sequences (see the present application on pages 5-6, D1, Figures 5-7, and D3, Figure 16).

Finally, the presence of LPAAT activity in rape seed was recognised, as indicated in D1, page 2, and D3, page 3, lines 30-34 (see description page 3, lines 12-16).

Thus, in order to solve the stated problem, a person skilled in the art, knowledgeable of the prior art teaching, would have made an attempt with reasonable chances of success, and would have been able to clone the LPAAT gene in rape seed, by use of conventional techniques. In addition to the method described in Example 1 of the application, other approaches were possible, such as, for instance, the use of oligonucleotide probes corresponding to the FPEGTRS and/or PFKKGA sequences, common to previously known sequences of LPAAT enzymes.

Consequently, the subject matter of the present set of claims does not appear to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

II.1. The peptide sequence of coconut endosperm LPAAT (see D3) is 31.2% identical to the present SEQ ID NO:2, over an overlap of 231aa. Thus, all of SEQ ID NO:2, is more than 20% identical to the sequence of D3. Consequently, D2 deprives Claim 1 of novelty (PCT Article 33(3)).

2. To the extent that the LPAAT sequence according to the present application is found in the wild state in rape seed, no distinctive feature enables a wild rape seed cell or a wild rape seed plant to be distinguished from the cells and plants claimed in Claims 5-7. It should be noted that the terms "recombinant" and "transformed" can not confer any

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 99/02827

distinctive feature onto the aforementioned cells and plants.

Consequently, the subject matter of claims 5, 6, and 7 is anticipated (PCT Article 33(2)) by any natural rape seed cell and plant.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02827

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Figure 1, mentioned on page 4, line 27 of the  
present application, is lacking.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>MJPcb539/79</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 02827</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>18/11/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>18/11/1998</b>
Déposant  <b>INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE et.al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

#### 1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

#### 4. En ce qui concerne le titre,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

#### 5. En ce qui concerne l'abrégé,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

#### 6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 99/02827

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/29 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 24674 A (GENE SHEARS PTY LTD ;SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAUL) 15 août 1996 (1996-08-15) page 2, ligne 8 -page 9, ligne 16 page 10, ligne 3 -page 11, ligne 6 ---	1-12
A	WO 94 13814 A (NICKERSON BIOCEM LTD ;SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAU) 23 juin 1994 (1994-06-23) abrégé; revendications ---	1-12
A	WO 95 27791 A (CALGENE INC ;DAVIES HUW MAELOR (US); HAWKINS DEBORAH (US); NELSEN) 19 octobre 1995 (1995-10-19) abrégé page 6, ligne 26 -page 9, ligne 38 --- -/--	1-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ceder, 0



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/02827

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>YU ET AL.: "A BAc end sequencing framework to sequence the rice genome"</p> <p>EMBL SEQUENCE DATABASE,</p> <p>4 novembre 1998 (1998-11-04), XP002109123</p> <p>HEIDELBERG DE</p> <p>Ac AQ274369</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1-3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02827

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9624674	A	15-08-1996	AU 4669096 A CA 2212570 A EP 0808368 A	27-08-1996 15-08-1996 26-11-1997
WO 9413814	A	23-06-1994	AU 694098 B AU 5656794 A AU 8932398 A CA 2151147 A CZ 9501506 A EP 0673424 A HU 71785 A PL 309327 A SK 76395 A US 5843739 A US 5945323 A	16-07-1998 04-07-1994 03-12-1998 23-06-1994 18-03-1998 27-09-1995 28-02-1996 02-10-1995 13-09-1995 01-12-1998 31-08-1999
WO 9527791	A	19-10-1995	US 5563058 A US 5824858 A US 5910630 A CA 2186607 A EP 0754232 A JP 9511650 T US 5968791 A	08-10-1996 20-10-1998 08-06-1999 19-10-1995 22-01-1997 25-11-1999 19-10-1999



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/29, 15/82, 5/10, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/29585</b> <b>(43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/02827 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 18 novembre 1999 (18.11.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/14470 18 novembre 1998 (18.11.98) FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05 (FR). UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX II [FR/FR]; 146, rue Léo-Saignat, F-33076 Bordeaux Cedex (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> RENARD, Michel [FR/FR]; 9, avenue du Stade, F-35650 Le Rheu (FR). ROSCOE, Thomas, James [GB/FR]; 2, rue Resseguier, F-66430 Alenya (FR). DELSENY, Michel [FR/FR]; 10, rue Jean Jaurès, F-66430 Bompas (FR). BOURGIS, Fabienne [FR/FR]; Laboratoire de Physiologie et Biologie Moléculaire des Plantes, 52, avenue de Villeneuve, F-66860		<b>(74) Mandataires:</b> VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). <b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> GENE CODING FOR AN ACYLTRANSFERASE OF OIL SEED RAPE AND USES THEREOF <b>(54) Titre:</b> GENE CODANT POUR UNE ACYLTRANSFERASE DE COLZA, ET SES UTILISATIONS <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a nucleic acid sequence coding for a lysophosphatidic acyltransferase of oil seed rape. Said sequence is useful in particular for transforming plants, so as to regulate the fatty acid content of the triglycerides produced by them.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une acyltransférase lysophosphatidique de colza. Cette séquence est utilisable notamment pour la transformation de végétaux, afin de réguler la teneur en acides gras des triglycérides produits par ceux-ci.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

GENE CODANT POUR UNE ACYLTRANSFERASE DE COLZA,  
ET SES UTILISATIONS

L'invention est relative à l'identification et au clonage d'un gène codant pour une acyltransférase, et  
5 à ses utilisations.

Les glycérolipides (glycolipides, phospholipides, et triacylglycérides) constituent chez les végétaux la majeure partie des lipides. Leur précurseur commun est le sn-1,2-diacylglycérol-3-phosphate ou acide phosphatidique (PA), résultant de l'estérification des positions  
10 sn-1 et sn-2 du glycérol-3-phosphate (G3P) par des acides gras. La sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) (E.C 2.3.1.15) catalyse l'acylation de la position sn-1 du G3P pour former le sn-1-acylglycérol-3-phosphate ou  
15 acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA est ensuite utilisé comme substrat par la 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase ou acyltransférase lysophosphatidique (LPAAT) (E.C.2.3.1.51) qui acyle la position sn-2 du glycérol. Dans la synthèse des triacylglycérides, qui constituent l'essentiel des lipides de réserve, intervient  
20 une troisième enzyme, la sn-1,2-diacylglycérol acyltransférase ou diacylglycérol acyltransférase (DAGAT) qui catalyse l'acylation de la position sn-3.

Les lipides végétaux sont utilisés actuellement dans des domaines très variés, de l'alimentation à  
25 l'industrie chimique, et il est souhaitable de disposer de plantes produisant des lipides spécifiquement adaptés à l'utilisation envisagée. Dans ce but, on cherche notamment à modifier la composition en acides gras des glycérolipides, et en particulier des triacylglycérides.  
30

Par exemple, dans le cas du colza (*Brassica napus*), on utilise pour l'huile alimentaire, les plantes ayant la teneur la plus faible possible en acide érucique. En revanche, on recherche une teneur élevée en acide  
35 érucique chez les plantes produisant des huiles destinées à l'utilisation industrielle.

La composition des glycérolipides en acides gras dépend essentiellement, d'une part de la répartition quantitative et qualitative des acides gras produits par la plante, et d'autre part de la spécificité de substrat des acyltransférases vis-à-vis de ces acides gras. Pour  
5 contrôler cette composition, il a été proposé d'agir séparément ou conjointement sur ces deux facteurs, en intervenant :

- au niveau de la biosynthèse des acides gras, pour favoriser ou au contraire inhiber la production d'un ou plusieurs acides gras spécifiques, et éventuellement pour induire la synthèse de nouveaux acides gras ;

- au niveau de l'acylation du G3P, pour modifier sa spécificité dans le sens souhaité.

15 Dans le cas du colza, les variétés les plus riches en acide érucique actuellement disponibles produisent une huile dans laquelle l'acide érucique représente au plus 50 à 60% des acides gras totaux. L'analyse des triacylglycérides des graines issues de ces variétés a  
20 montré que cet acide est présent quasi exclusivement aux positions sn-1 et sn-3 ; cette répartition sélective a été attribuée à la spécificité de substrat de la LPAAT de colza, qui exclurait les acides gras à très longue chaîne (>C20) ; ceci limite la teneur en acide érucique des  
25 triacylglycérides de graines de colza à un seuil théorique maximal de 66% des acides gras totaux.

Dans le but de s'affranchir de cette limitation, le gène d'une LPAAT de *Limnanthes alba* capable d'incorporer l'acide érucique en position sn-2 a été exprimé dans les graines d'une variété de colza à taux élevé en acide érucique. Cependant, bien qu'une incorporation d'acide érucique en position sn-2 ait effectivement été observée dans les triacylglycérides des graines de ce colza transgénique, cette incorporation est restée faible ; en outre, la quantité totale d'acide érucique incorporée dans ces triacylglycérides n'était pas supé-  
35

rieure à celle des plantes témoin non transformées [LASSNER et al., Plant Physiol. 109:1389-1394, (1995)].

5 Ce résultat pourrait s'expliquer, en dehors de l'éventualité d'une production limitante d'acide érucique, par une faible spécificité de la LPPAT exogène de *Limnanthes*, qui, outre l'acide érucique, pourrait également incorporer de l'acide oléique, et également par l'existence d'une compétition entre l'activité LPAAT exogène et une activité LPAAT endogène du colza, qu'il se-  
10 rait nécessaire d'inhiber pour augmenter l'incorporation d'acide érucique.

Jusqu'à présent, on ne disposait que de peu d'informations sur l'enzyme ou les enzymes responsable(s) de l'activité LPAAT chez le colza. Les LPAAT sont en ef-  
15 fet des enzymes membranaires, difficiles à purifier sous forme active.

A l'exception de la LPAAT de noix de coco [KNUTZON et al., Plant Physiol. 109:999-1006, (1995)], qui a été purifiée à partir des membranes de l'albumen,  
20 et dont le gène a été ultérieurement isolé par criblage d'une banque d'ADNC, les LPAAT végétales déjà identifiées ont pour la plupart été caractérisées par des techniques de génétique moléculaire. Il s'agit de la LPAAT de maïs [BROWN et al., Plant Mol. Biol., 26:211-223, (1994)], des  
25 LPAAT de *Limnanthes* [BROWN et al., Plant Mol. Biol., 29:267-278, (1995); HANKE et al., Eur. J. Biochem. 232:806-810, (1995)].

Afin de permettre l'amélioration du contrôle de l'acylation en position sn-2, les Inventeurs ont en-  
30 trepris de caractériser la ou les enzymes impliquée(s) dans l'activité LPAAT chez le colza.

Ils sont ainsi parvenus à isoler une séquence d'ADN de *Brassica napus* codant pour une LPAAT plastidiale fonctionnelle ; cette LPAAT sera dénommée ci-après BAT2  
35 (Brassica Acyl-Transférase 2).

Une séquence d'acide nucléique comprenant la séquence codant pour BAT2 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, et la séquence polypeptidique déduite est représentée sous le  
5 numéro SEQ ID NO: 2.

2 codons ATG pouvant constituer des sites potentiels d'initiation de la traduction sont présents sur la séquence SEQ ID NO: 1 ; le polypeptide de 344 acides aminés débutant au résidu méthionine en position 16 de la  
10 séquence SEQ ID NO: 2 est suffisant pour l'activité LPAAT.

L'analyse de la séquence en acides aminés de BAT2 par le logiciel pSORT suggère la présence d'une séquence signal comprise dans les 95 acides aminés N-terminaux de la séquence SEQ ID NO: 2. Cette séquence signal est impliquée dans l'adressage de la LPPAT BAT2 dans la membrane plastidiale.

La séquence de la protéine mature active est comprise dans les 279 acides aminés C-terminaux.

20 La comparaison, à l'aide du logiciel BLASTX2 [GISH et al., Nat. Genet., 31:266-272, (1994)] entre la séquence peptidique de BAT2, et les séquences peptidiques de LPAAT précédemment connues, fait apparaître une très faible homologie (au maximum 20% d'identité) lorsque la  
25 comparaison est effectuée sur l'ensemble de la séquence.

Sur certaines régions de la séquence, on observe une homologie plus importante. La figure 1 représente l'alignement de la séquence 187-302 de BAT2 avec les séquences des LPAAT présentant la plus forte homologie. Les scores les plus importants sont observés avec :  
30

- le produit du gène *SLC1* de *S. cerevisiae* (P33333) [NAGIAC et al. J. Biol. Chem., 268:22145-22163, (1993)] : 32% d'identité et 51% d'équivalence, sur un alignement de 204 acides aminés ;

35 - la LPAAT microsomale des graines de *Limnanthes* (Q42870) [HANKE et al., Eur. J. Biochem., 232:806-810,



(1995) ; LASSNER et al., Plant Physiol. 109:1389-1394,  
(1995) ; BROWN et al., Plant Mol. Biol., 29:267-  
278, (1995)] : 30% d'identité et 54% d'équivalence, sur un  
alignement de 182 acides aminés ;

5           - la LPAAT d'endosperme de noix de coco  
(Q42670) [KNUTZON et al., Plant Physiol. 109:999-1006,  
(1995)] : 31% d'identité et 47% d'équivalence, sur un  
alignement de 229 acides aminés ;

10           - la LPAAT hypothétique de *Synechocystis*,  
(P74498) : 30% d'identité et 55% d'équivalence, sur un  
alignement de 143 acides aminés ;

          - la protéine plsC de *E. Coli* (P26647) : 31%  
d'identité et 50% d'équivalence, sur un alignement de 115  
acides aminés.

15           La présente invention a pour objet un fragment  
d'acide nucléique comprenant :

a) une séquence codant pour une LPAAT végétale  
dont la séquence peptidique présente au moins 20%, de  
préférence au moins 30% et avantageusement au moins 50 à  
20   95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 2 ; et/ou

b) une séquence complémentaire de la séquence  
codante a) ci-dessus.

25           Selon un mode de réalisation préféré de la  
présente invention, ladite séquence codante code pour le  
polypeptide de séquence SEQ ID NO: 2.

30           L'invention englobe également des fragments de  
plus de 20pb, et de préférence de plus de 30pb, d'une sé-  
quence codante telle que définie ci-dessus, ou capables  
de s'hybrider spécifiquement en conditions stringentes,  
avec ladite séquence. Ceci inclut en particulier les  
fragments de toute séquence codant pour le polypeptide  
SEQ ID NO: 2, ou de sa séquence complémentaire, à  
l'exception des fragments constitués par un oligonucléo-  
tide codant pour l'une des séquences peptidiques suivan-  
35   tes (code 1 lettre) :

FPEGTRS ;

PFKKGA ;

qui sont communes à des LPAATs de séquences antérieurement connues, ou des fragments complémentaires dudit oligonucléotide.

5 Des fragments d'acide nucléique conformes à l'invention peuvent en particulier être utilisés comme amorces et/ou sondes, pour détecter et cloner des séquences codant pour des LPAATs plastidiales, de colza ou d'autres végétaux, ainsi que des séquences codant pour  
10 des LPAATs de colza ou d'autres espèces, notamment de crucifères, exprimées dans des compartiments cellulaires autres que les plastes, en particulier le réticulum endoplasmique.

Les analyses effectuées par transfert de Southern et par RFLP, en utilisant comme sonde d'hybridation  
15 en conditions stringentes l'ADNc de BAT2, marqué au  $^{32}\text{P}$ , montrent la présence dans le génome du colza, ainsi que dans le génome d'*A. thaliana*, d'au moins 2 exemplaires homologues du gène BAT2, et permettent de supposer que ce  
20 gène fait partie d'une famille multigénique comprenant 4 membres.

La présente invention a également pour objet :

- les vecteurs recombinants résultant de l'insertion d'au moins un fragment d'acide nucléique  
25 conforme à l'invention, dans un vecteur approprié ; avantageusement, il s'agit de vecteurs d'expression dans lesquels le fragment d'acide nucléique conforme à l'invention est inséré sous contrôle transcriptionnel de séquences de régulation (telles que promoteur et/ou terminateur)  
30 fonctionnelles dans une cellule-hôte dans laquelle on souhaite exprimer ledit fragment.

- les cellules-hôtes, procaryotes ou eucaryotes, et les organismes pluricellulaires, en particulier des cellules végétales et des végétaux, transformés par  
35 au moins un fragment d'acide nucléique conforme à l'invention.

L'invention englobe également la LPAAT recombinante ou les fragments de LPAAT recombinante, résultant de l'expression dans une cellule-hôte, de la séquence codant pour ladite LPAAT ou ledit fragment, portée par un  
5 fragment d'acide nucléique conforme à l'invention. La LPAAT recombinante conforme à l'invention, ou ses fragments, peuvent par exemple être utilisés pour produire des anticorps anti-LPAAT, permettant le criblage de banques d'expression d'ADNc dans le cadre de la détection et  
10 du clonage d'autres LPAATs.

Des fragments d'acide nucléique conformes à l'invention peuvent avantageusement être utilisés, en orientation sens ou antisens, pour produire des plantes transgéniques, notamment à partir de colza ou d'autres  
15 plantes oléagineuses, afin de réguler l'activité LPAAT chez la plante ainsi transformée, et agir sur la composition en acides gras des lipides, et en particulier des triacylglycérides, produits par cette plante.

La présente invention englobe également les  
20 plantes transgéniques produites de la sorte.

Ces plantes peuvent être obtenues par les techniques habituelles, connues en elles-mêmes, de transgénése végétale. Selon l'utilisation envisagée, une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention peut être  
25 placée sous contrôle d'un promoteur inductible ou d'un promoteur constitutif, d'un promoteur ubiquitaire, ou d'un promoteur tissu-spécifique. Ces plantes peuvent également contenir d'autres transgènes, préférentiellement des transgènes dérivés de gènes impliqués dans la biosynthèse des lipides.  
30

On peut en particulier obtenir :

- des plantes transgéniques, exprimant au moins une séquence conforme à l'invention codant pour une LPAAT fonctionnelle, en lieu et place d'une ou plusieurs  
35 séquences codant des LPAAT endogènes, ou en supplément de celles-ci ;

- des plantes transgéniques exprimant au moins une séquence conforme à l'invention en orientation anti-sens, afin d'inhiber l'expression des LPAAT endogènes homologues, et favoriser ainsi l'activité d'autres LPAATs, d'origine endogène ou exogène.

Par exemple :

- pour produire des colzas transgéniques à teneur élevée en acide érucique, on peut co-transformer le colza avec d'une part une séquence d'ADN codant pour une LPAAT incorporant préférentiellement l'acide érucique en position *sn*-2, telle que la LPAAT de *Limnanthes alba* [LASSNER et al., (1995), publication précitée], et d'autre part une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention en orientation antisens, afin d'inhiber au moins en partie, la production de LPAAT endogène entrant en compétition avec l'activité de la LPAAT exogène de *Limnanthes* ;

- pour augmenter la teneur globale des graines en triglycérides, on peut transformer le colza avec une séquence d'ADN conforme à l'invention, codant pour une LPAAT plastidiale délétée de sa séquence d'adressage dans les plastes ;

- pour augmenter la teneur en acides gras saturés, en particulier en acide palmitique, on peut co-transformer le colza avec une séquence d'ADN conforme à l'invention, codant pour une LPAAT plastidiale délétée de sa séquence d'adressage dans les chloroplastes, et avec un ou plusieurs gènes d'ACP-thioestérases utilisant préférentiellement des palmitoyl-ACP comme substrats.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'identification, et le clonage d'un gène codant pour la LPAAT BAT2 de *Brassica napus*.

# EXEMPLE 1 : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE L'ADNc D'UNE LPAAT DE COLZA

Pour rechercher la présence de gènes codant pour des LPAAT, une banque d'ADNc d'embryons immatures de colza a été criblée par complémentation hétérologue de la mutation du gène *plsC* de la souche JC201 d'E. Coli [COLEMAN, J. Biol. Chem., 265:17215-17221, (1990)]. Cette mutation ponctuelle confère aux mutants JC201 un phénotype thermosensible, du fait de l'inactivation à température élevée de la LPAAT codée par le gène *plsC*. Ces mutants poussent bien à 30°C, difficilement à 37°C et pas du tout à 42-44°C.

Pour le criblage, une banque de phagemides dérivée de  $2 \times 10^6$  clones prélevés sur une banque d'ADNc d'embryons immatures de colza clonés dans le vecteur lambda ZAPII (STRATAGENE), a été construite en utilisant le kit « ExAssist » (STRATAGENE).

Les bactéries sont transformées par électroporation avec ces phagemides, puis cultivées sur LB agar, en présence d'ampicilline et d'IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-galactothiopyranoside). Les bactéries qui poussent à 42°C sont sélectionnées. L'ADN plasmidique des clones capables de pousser à 42°C a été analysé par PCR, pour déterminer la taille de l'insert. Après 3 cycles de transformation suivie de sélection, environ 85% des clones contiennent un insert de 1,2 kb environ. Le séquençage des extrémités des inserts de 4 de ces clones montre qu'ils sont identiques. L'un de ces clones, dénommé pBAT2, a été entièrement séquencé.

## EXEMPLE 2 : SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DE BAT2 ET SEQUENCE PEPTIDIQUE DEDUITE.

L'ADNc du clone pBAT2 comprend une séquence de 1155pb suivie d'une queue poly(A) de 18 résidus. Cette séquence comprend une phase unique de lecture ouverte, correspondant à un polypeptide de 351 acides aminés, qui représente une protéine de fusion, comprenant 344 acides

aminés de la séquence de pBAT2, et une partie de la séquence de la  $\beta$ -galactosidase du vecteur de clonage. La séquence qui est représentée sur la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, comprend en outre une  
5 partie de la séquence génomique (nucléotides 1 à 79 de la séquence SEQ ID NO: 1) située en amont de la séquence d'ADNc de pBAT2.

2 codons ATG pouvant constituer des sites potentiels d'initiation de la traduction ont été localisé  
10 sur la séquence SEQ ID NO: 1 ; si le premier d'entre eux (position 58 de la séquence SEQ ID NO: 1) est utilisé, le produit de traduction de la séquence SEQ ID NO: 1 est un polypeptide de 359 acides aminés, dont le poids moléculaire et le pI théoriques sont respectivement de 39,6  
15 kDa, et d'environ 9,8 ; ce polypeptide est représenté sur la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 2. Si l'initiation de la traduction s'effectue au niveau du 2<sup>ème</sup> codon ATG (position 103 de la séquence SEQ ID NO: 1), le produit de traduction est un polypeptide de 344 acides aminés, dont le poids moléculaire  
20 théorique est d'environ 37,9 kDa.

L'analyse de la séquence en acides aminés de BAT2 par le logiciel pSORT suggère la présence d'un peptide signal d'environ 80 à 95 résidus. Cette séquence  
25 gnal potentielle est riche en sérine, en alanine, en valine, et en acides aminés basiques, ce qui est caractéristique des séquences d'adressage vers la membrane des chloroplastes.

L'analyse de la séquence polypeptidique indique également la présence de deux domaines transmembranaires potentiels, respectivement situés entre les acides  
30 aminés 124 à 140, et 219 à 235.

Les séquences consensus des LPAAT (FPEGTRS et PFKKGA), sont respectivement situées aux positions 273-  
35 279 et 286-291 de la séquence SEQ ID NO: 2 ; une séquence correspondant à la séquence consensus NHXXXXD, qui est

conservée chez toutes les acyltransférases membranaires connues jusqu'à présent, est localisée aux positions 202-208 de la séquence SEQ ID NO: 2.

### EXEMPLE 3 : ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA PROTEINE CODEE PAR L'INSERT D'ADNC DE pBAT2

Pour vérifier que la protéine codée par l'insert de pBAT2 possédait effectivement une activité LPAAT, la capacité de cette protéine à incorporer l'acide oléique ou de l'acide palmitique en position sn-2 du LPA, a été testée.

La souche *E. coli* JC201 transformée avec pBAT2, et à titre de témoins, la souche *E. coli* JC201 non-transformée, ou transformée avec le vecteur (pBSK) dépourvu de l'insert d'ADNC de BAT2, sont mises en culture à 30°C jusqu'à une densité optique de 0,5.

Après induction par l'IPTG, et culture pendant 3 h à 30°C, les bactéries sont lysées et fractionnées et l'activité spécifique LPAAT est mesurée, sur les extraits membranaires bruts, en présence d'oléoyl-CoA(1-<sup>14</sup>C) ou de palmitoyl-CoA(1-<sup>14</sup>C), selon le protocole de CAO et al. [Plant Physiol., 9:1199-1206, (1990)].

Les résultats sont illustrés par le tableau I ci-dessous, qui indique l'activité spécifique, en pmol d'acide phosphatidique formées/mg de protéine/heure.

TABLEAU I

CULTURE	SUBSTRAT	
	Oléoyl-CoA(1- <sup>14</sup> C)	Palmitoyl-CoA(1- <sup>14</sup> C)
JC201	1,86	3,74
JC201+pBSK	1,65	1,59
JC201+pBAT2	5,8	11,06

Les extraits membranaires de la culture transformée avec pBAT2 présentent une activité LPAAT supérieure à celle des extraits membranaires obtenus à partir de la culture non-transformée, ou transformée avec le vecteur pBSK, ce qui montre que l'activité LPAAT est effectivement restaurée par le produit de traduction de l'insert de pBAT2.

**EXEMPLE 4 : LOCALISATION CELLULAIRE DE BAT2**

La localisation plastidique suggérée par l'analyse de séquence de BAT2 a été vérifiée en testant la capacité de chloroplastes de pois isolés à importer  
5 BAT2.

Dans ce but, l'ADNc du clone pBAT2 a été transcrit *in vitro*, en utilisant l'ARN polymérase T3 ; le transcrit est traduit en système acellulaire de germe de blé, en présence de méthionine marquée au <sup>35</sup>S. On obtient  
10 ainsi un produit de traduction d'environ 40 kDa. Ce produit est incubé avec des chloroplastes isolés de pois. Après l'incubation, les chloroplastes sont traités à la protéase et fractionnés, selon le protocole décrit par BROCK et al. [Plant Mol. Biol. 23(4), 717, (1993)], et  
15 les différentes fractions analysées par électrophorèse pour rechercher le produit marqué au <sup>35</sup>S.

Les résultats de cette analyse montrent que le produit de traduction de BAT2 est importé dans les chloroplastes de pois, et clivé en une protéine de 32 kDa qui  
20 est essentiellement localisée dans la fraction membranaire, et un peptide signal de 8kDa.

Ces résultats confirment que la protéine BAT2 est bien synthétisée avec un peptide signal dont le rôle est d'importer la protéine dans la membrane des chloroplastes. Le précurseur a une masse apparente d'environ  
25 40 kDa et le peptide signal d'environ 8 kDa.

**EXEMPLE 5 : LOCALISATION DE L'EXPRESSION DU GENE BAT2**

L'expression du gène BAT2 a été étudiée dans différents organes de *B. napus* et d'*A. thaliana*.

L'étude a été effectuée par transfert de Northern, en utilisant une sonde correspondant à la séquence codante de BAT2, sur des ARN totaux de tiges, de racines, de feuilles, de fleurs, de graines en cours de développement [28 JAP (jours après pollinisation)], et de graines  
35 sèches.



Dans chacun des tissus de *B. napus* et d'*A. thaliana* testés, on observe l'hybridation de la sonde avec un transcrit d'environ 1,3 kb chez *B. napus*, et avec un transcrit d'environ 1 kb chez *A. thaliana*. L'intensité du signal d'hybridation est similaire dans tous les tissus, y compris les tissus non-photosynthétiques contenant des plastides autres que les chloroplastes. L'observation d'une hybridation dans les graines matures, indique en outre que le messager de BAT2 demeure stable lors de la maturation de la graine.

## REVENDEICATIONS

- 1) Fragment d'acide nucléique comprenant :
- a) une séquence codant pour une LPAAT végétale dont la séquence peptidique présente au moins 20% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 2 ; et/ou
- 5 b) une séquence complémentaire de la séquence codante a) ci-dessus.
- 2) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence codante
- 10 code pour le polypeptide de séquence SEQ ID NO: 2.
- 3) Fragment d'acide nucléique de plus de 20pb, capable de s'hybrider spécifiquement en conditions strictes avec une séquence codante telle que définie dans une quelconque des revendications 1 ou 2, à l'exception
- 15 des fragments constitués par un oligonucléotide codant pour l'une des séquences peptidiques suivantes :
- FPEGTRS ;
- PFKKGA ;
- ou par son complémentaire.
- 20 4) Vecteur recombinant contenant un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Cellule transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 25 6) Cellule transformée selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule végétale.
- 7) Plante transgénique transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 30 8) Utilisation d'un fragment d'acide nucléique selon une quelconque des revendications 1 à 3, pour réguler l'activité LPAAT chez une plante.
- 35 9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite plante est le colza.

10) Utilisation selon une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisée en ce que ledit fragment d'acide nucléique est utilisé en orientation anti-sens.

5

11) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit fragment d'acide nucléique est utilisé pour exprimer une LPAAT fonctionnelle.

12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite LPAAT est déletée de sa sé-  
10 quence d'adressage dans les plastes.

## LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE  
UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX II  
RENARD, Michel  
ROSCOE, Thomas James  
DELSENY, Michel  
BOURGIS, Fabienne  
BARRET, Pierre  
GUERCHE, Philippe

<120> GENE CODANT POUR UNE ACYLTRANSFERASE DE COLZA, ET SES  
UTILISATIONS

<130> MJPCb539/79

<140>

<141>

<150> FR9814470

<151> 1998-11-18

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1253

<212> ADN

<213> Brassica napus

<220>

<221> CDS

<222> (58)...(1134)

<400> 1  
taaaaacagc agagaaaaga gtcaagagat aaaagcaatg aagatggaga gataagc 57  
  
atg agc aaa tct cac gga cga tgt ttt agc tcg cga gat tcc gcc atg 105  
Met Ser Lys Ser His Gly Arg Cys Phe Ser Ser Arg Asp Ser Ala Met  
1 5 10 15  
  
gat gtc gct tct gct cgg ggg gtc tcc tca cat cct cca tat tat agc 153  
Asp Val Ala Ser Ala Arg Gly Val Ser Ser His Pro Pro Tyr Tyr Ser  
20 25 30  
  
aaa ccc att tgt tca tca cag tca tcg ttg att cgg att ccg atc agt 201  
Lys Pro Ile Cys Ser Ser Gln Ser Ser Leu Ile Arg Ile Pro Ile Ser  
35 40 45  
  
aaa gga tgt tgc ttt gct cgt tct tcg aac ttg att act tcc ctt cat 249  
Lys Gly Cys Cys Phe Ala Arg Ser Ser Asn Leu Ile Thr Ser Leu His  
50 55 60  
  
gct gct tcg aga ggg gtg aca agg cgt act agt ggt gta caa tgg tgt 297  
Ala Ala Ser Arg Gly Val Thr Arg Arg Thr Ser Gly Val Gln Trp Cys  
65 70 75 80

tac cgt tct att aga ttt gac cct ttc aaa gtt aat gat aag aac tca	345
Tyr Arg Ser Ile Arg Phe Asp Pro Phe Lys Val Asn Asp Lys Asn Ser	
85 90 95	
aga act gtg act gtg aga tcg gat ctt tca gga gct gca acc cct gaa	393
Arg Thr Val Thr Val Arg Ser Asp Leu Ser Gly Ala Ala Thr Pro Glu	
100 105 110	
tct act tat cca gaa cca gag att aag ttg agc tca aga ctc aga ggg	441
Ser Thr Tyr Pro Glu Pro Glu Ile Lys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Gly	
115 120 125	
ata tgc ttc tgt ctc gtt gct ggc atc tcc gcc att gtt ctc atc gtc	489
Ile Cys Phe Cys Leu Val Ala Gly Ile Ser Ala Ile Val Leu Ile Val	
130 135 140	
ctg atg atc att ggc cat ccc ttc gtc ctt cta ttt gat cgt tac agg	537
Leu Met Ile Ile Gly His Pro Phe Val Leu Leu Phe Asp Arg Tyr Arg	
145 150 155 160	
aga aag ttc cat cac ttc att gct aag ctt tgg gct tcc ata agc atc	585
Arg Lys Phe His His Phe Ile Ala Lys Leu Trp Ala Ser Ile Ser Ile	
165 170 175	
tac ccg ttt tac aaa aca gac atc caa ggt ttg gag aat ctg ccg tcg	633
Tyr Pro Phe Tyr Lys Thr Asp Ile Gln Gly Leu Glu Asn Leu Pro Ser	
180 185 190	
tca gac act cct tgt gta tac gtt tcg aac cac caa agc ttt ctg gat	681
Ser Asp Thr Pro Cys Val Tyr Val Ser Asn His Gln Ser Phe Leu Asp	
195 200 205	
ata tac aca ctt ctc agc ctt ggc caa agc tat aag ttc atc agc aag	729
Ile Tyr Thr Leu Leu Ser Leu Gly Gln Ser Tyr Lys Phe Ile Ser Lys	
210 215 220	
aca ggg ata ttc gtt att cct gtc atc ggt tgg gct atg tcc atg atg	777
Thr Gly Ile Phe Val Ile Pro Val Ile Gly Trp Ala Met Ser Met Met	
225 230 235 240	
ggg gtt gtt ccc ttg aag agg atg gac cca aga agc caa gtg gat tgc	825
Gly Val Val Pro Leu Lys Arg Met Asp Pro Arg Ser Gln Val Asp Cys	
245 250 255	
tta aaa cgc tgc atg gaa cta gtg aag aag gga gct tcc gtc ttt ttc	873
Leu Lys Arg Cys Met Glu Leu Val Lys Lys Gly Ala Ser Val Phe Phe	
260 265 270	
ttc cca gag gga acg agg agt aag gat ggt cgg tta ggt cct ttc aag	921
Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Lys Asp Gly Arg Leu Gly Pro Phe Lys	
275 280 285	
aaa ggg gct ttt acg ata gca gct aag aca gga gtt cca gtg gtg cca	969
Lys Gly Ala Phe Thr Ile Ala Ala Lys Thr Gly Val Pro Val Val Pro	
290 295 300	
ata acg ctg atg gga aca ggg aag atc atg ccg acg ggt agt gaa ggt	1017
Ile Thr Leu Met Gly Thr Gly Lys Ile Met Pro Thr Gly Ser Glu Gly	
305 310 315 320	

ata ctg aat cat ggg gat gtg aga gtg atc atc cac aag ccg ata tat 1065  
 Ile Leu Asn His Gly Asp Val Arg Val Ile Ile His Lys Pro Ile Tyr  
                   325                                  330                                  335

gga agc aaa gct gat gtt ctt tgc gaa gag gcg aga aac aag ata gct 1113  
 Gly Ser Lys Ala Asp Val Leu Cys Glu Glu Ala Arg Asn Lys Ile Ala  
                   340                                  345                                  350

gaa tct atg aat ctc ttg agt tgaaacgttt gttttttaag cagtgtctct 1164  
 Glu Ser Met Asn Leu Leu Ser  
                   355

atgaacaatg agaaggctaa accatttttta catgtcagtt ttattgttta aaataaaaatt 1224

taggcttttc aaaaaaaaaa aaaaaaaad 1253

<210> 2

<211> 359

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 2

Met Ser Lys Ser His Gly Arg Cys Phe Ser Ser Arg Asp Ser Ala Met  
                   1                  5                                  10                                  15

Asp Val Ala Ser Ala Arg Gly Val Ser Ser His Pro Pro Tyr Tyr Ser  
                   20                                  25                                  30

Lys Pro Ile Cys Ser Ser Gln Ser Ser Leu Ile Arg Ile Pro Ile Ser  
                   35                                  40                                  45

Lys Gly Cys Cys Phe Ala Arg Ser Ser Asn Leu Ile Thr Ser Leu His  
                   50                                  55                                  60

Ala Ala Ser Arg Gly Val Thr Arg Arg Thr Ser Gly Val Gln Trp Cys  
                   65                                  70                                  75                                  80

Tyr Arg Ser Ile Arg Phe Asp Pro Phe Lys Val Asn Asp Lys Asn Ser  
                   85                                  90                                  95

Arg Thr Val Thr Val Arg Ser Asp Leu Ser Gly Ala Ala Thr Pro Glu  
                   100                                  105                                  110

Ser Thr Tyr Pro Glu Pro Glu Ile Lys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Gly  
                   115                                  120                                  125

Ile Cys Phe Cys Leu Val Ala Gly Ile Ser Ala Ile Val Leu Ile Val  
                   130                                  135                                  140

Leu Met Ile Ile Gly His Pro Phe Val Leu Leu Phe Asp Arg Tyr Arg  
                   145                                  150                                  155                                  160

Arg Lys Phe His His Phe Ile Ala Lys Leu Trp Ala Ser Ile Ser Ile  
                   165                                  170                                  175

Tyr Pro Phe Tyr Lys Thr Asp Ile Gln Gly Leu Glu Asn Leu Pro Ser  
                   180                                  185                                  190

Ser Asp Thr Pro Cys Val Tyr Val Ser Asn His Gln Ser Phe Leu Asp  
                   195                                  200                                  205

Ile Tyr Thr Leu Leu Ser Leu Gly Gln Ser Tyr Lys Phe Ile Ser Lys  
210 215 220

Thr Gly Ile Phe Val Ile Pro Val Ile Gly Trp Ala Met Ser Met Met  
225 230 235 240

Gly Val Val Pro Leu Lys Arg Met Asp Pro Arg Ser Gln Val Asp Cys  
245 250 255

Leu Lys Arg Cys Met Glu Leu Val Lys Lys Gly Ala Ser Val Phe Phe  
260 265 270

Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Lys Asp Gly Arg Leu Gly Pro Phe Lys  
275 280 285

Lys Gly Ala Phe Thr Ile Ala Ala Lys Thr Gly Val Pro Val Val Pro  
290 295 300

Ile Thr Leu Met Gly Thr Gly Lys Ile Met Pro Thr Gly Ser Glu Gly  
305 310 315 320

Ile Leu Asn His Gly Asp Val Arg Val Ile Ile His Lys Pro Ile Tyr  
325 330 335

Gly Ser Lys Ala Asp Val Leu Cys Glu Glu Ala Arg Asn Lys Ile Ala  
340 345 350

Glu Ser Met Asn Leu Leu Ser  
355

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02827

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/29 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 24674 A (GENE SHEARS PTY LTD ;SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAUL) 15 August 1996 (1996-08-15) page 2, line 8 -page 9, line 16 page 10, line 3 -page 11, line 6 ---	1-12
A	WO 94 13814 A (NICKERSON BIOCEM LTD ;SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAU) 23 June 1994 (1994-06-23) abstract; claims ---	1-12
A	WO 95 27791 A (CALGENE INC ;DAVIES HUW MAELOR (US); HAWKINS DEBORAH (US); NELSEN) 19 October 1995 (1995-10-19) abstract page 6, line 26 -page 9, line 38 --- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2000

Date of mailing of the international search report

25/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, 0



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02827

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YU ET AL.: "A BAc end squencing framework to sequence the rice genome" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 November 1998 (1998-11-04), XP002109123 HEIDELBERG DE Ac AQ274369 the whole document -----</p>	1-3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02827

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9624674 A	15-08-1996	AU 4669096 A	27-08-1996
		CA 2212570 A	15-08-1996
		EP 0808368 A	26-11-1997
-----			
WO 9413814 A	23-06-1994	AU 694098 B	16-07-1998
		AU 5656794 A	04-07-1994
		AU 8932398 A	03-12-1998
		CA 2151147 A	23-06-1994
		CZ 9501506 A	18-03-1998
		EP 0673424 A	27-09-1995
		HU 71785 A	28-02-1996
		PL 309327 A	02-10-1995
		SK 76395 A	13-09-1995
		US 5843739 A	01-12-1998
		US 5945323 A	31-08-1999
-----			
WO 9527791 A	19-10-1995	US 5563058 A	08-10-1996
		US 5824858 A	20-10-1998
		US 5910630 A	08-06-1999
		CA 2186607 A	19-10-1995
		EP 0754232 A	22-01-1997
		JP 9511650 T	25-11-1999
		US 5968791 A	19-10-1999

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: Je internationale No

PCT/FR 99/02827

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/29 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 24674 A (GENE SHEARS PTY LTD ;SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAUL) 15 août 1996 (1996-08-15) page 2, ligne 8 -page 9, ligne 16 page 10, ligne 3 -page 11, ligne 6 ---	1-12
A	WO 94 13814 A (NICKERSON BIOCEM LTD ;SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAU) 23 juin 1994 (1994-06-23) abrégé; revendications ---	1-12
A	WO 95 27791 A (CALGENE INC ;DAVIES HUW MAELOR (US); HAWKINS DEBORAH (US); NELSEN) 19 octobre 1995 (1995-10-19) abrégé page 6, ligne 26 -page 9, ligne 38 --- -/--	1-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ceder, 0

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. le internationale No

PCT/FR 99/02827

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>YU ET AL.: "A BAC end squencing framework to sequence the rice genome" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 novembre 1998 (1998-11-04), XP002109123 HEIDELBERG DE Ac AQ274369 le document en entier -----</p>	1-3

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: le Internationale No

PCT/FR 99/02827

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9624674 A	15-08-1996	AU 4669096 A	27-08-1996
		CA 2212570 A	15-08-1996
		EP 0808368 A	26-11-1997
WO 9413814 A	23-06-1994	AU 694098 B	16-07-1998
		AU 5656794 A	04-07-1994
		AU 8932398 A	03-12-1998
		CA 2151147 A	23-06-1994
		CZ 9501506 A	18-03-1998
		EP 0673424 A	27-09-1995
		HU 71785 A	28-02-1996
		PL 309327 A	02-10-1995
		SK 76395 A	13-09-1995
		US 5843739 A	01-12-1998
		US 5945323 A	31-08-1999
WO 9527791 A	19-10-1995	US 5563058 A	08-10-1996
		US 5824858 A	20-10-1998
		US 5910630 A	08-06-1999
		CA 2186607 A	19-10-1995
		EP 0754232 A	22-01-1997
		JP 9511650 T	25-11-1999
		US 5968791 A	19-10-1999